

AA

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
29 de Enero de 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2004/009060 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: **A61K 9/51**

(21) Número de la solicitud internacional:  
**PCT/ES2003/000372**

(22) Fecha de presentación Internacional:  
16 de Julio de 2003 (16.07.2003)

(25) Idioma de presentación: **español**

(26) Idioma de publicación: **español**

(30) Datos relativos a la prioridad:  
**P 2002 01694 19 de Julio de 2002 (19.07.2002) ES**

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*): **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA [ES/ES]**; Edificio CACTUS - CITT - Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e  
(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **ALONSO FERNÁNDEZ, María, José [ES/ES]**; Depto de Farmacia e Tecnología Farmacéutica, Facultade de Farmacia, Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES). **REMUÑÁN LÓPEZ, Carmen [ES/ES]**; Depto de Farmacia e Tecnología Farmacéutica, Fde de Farmacia, Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES). **CUÑA VILÁN, Margarita,**

**María [ES/ES]**; Depto de Farmacia e Tecnología Farmacéutica, Fde de Farmacia, Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES). **ALONSO SANDE, María [ES/ES]**; Depto de Farmacia e Tecnología Farmacéutica, Fde de Farmacia, Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES). **VILA JATO, José, Luis [ES/ES]**; Depto de Farmacia e Tecnología Farmacéutica, Fde de Farmacia, Campus sur, 15782 Santiago de Compostela (ES).

(74) Mandatario: **DAVILA BAZ, Angel**; C/ Goya No. 11, 28001 Madrid (ES).

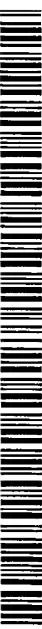
(81) Estados designados (*nacional*): **CA, US.**

(84) Estados designados (*regional*): **patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).**

**Publicada:**

- *con informe de búsqueda internacional*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*



A1

WO 2004/009060

(54) Title: NANOPARTICLES FOR THE ADMINISTRATION OF ACTIVE INGREDIENTS, METHOD OF PRODUCING SAID PARTICLES AND COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) Título: NANOPARTÍCULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS, PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE DICHAS PARTÍCULAS Y COMPOSICIÓN QUE LAS CONTIENEN.

(57) Abstract: The invention relates to nanoparticles used for the administration of active ingredients, the method of producing said nanoparticles and compositions containing same. The inventive nanoparticles comprise a chitosan, glucomannan, at least one active ingredient and, if necessary, an anionic salt, preferably in sodium tripolyphosphate form. Said nanoparticles can be used to administer active ingredients to a human or animal body.

(57) Resumen: Nanopartículas para la administración de ingredientes activos, procedimiento para la elaboración de dichas nanopartículas y composiciones que las contienen, comprendiendo dichas nanopartículas quitosano, glucomanano, al menos un ingrediente activo, y, en caso dado, una sal aniónica, de forma preferida tripolifosfato sódico, las cuales pueden ser utilizadas para administrar ingredientes activos al cuerpo humano o animal.

IAP20 Reg'd PCT/ES2003/000372 20 DEC 2005

**NANOPARTÍCULAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS, PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE DICHAS PARTÍCULAS Y COMPOSICIÓN QUE LAS CONTIENEN.**

5    **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden quitosano, glucomanano, al menos un ingrediente activo, y, en caso dado, una sal aniónica, de forma preferida tripolifosfato sódico, las cuales pueden ser utilizadas para administrar ingredientes activos al cuerpo humano o animal. Además, se refiere también a un procedimiento para obtener dichas nanopartículas, y a una composición que comprende dichas nanopartículas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Es conocido que la administración de numerosos ingredientes activos por diferentes vías de administración al cuerpo humano o animal presenta diversas dificultades. Especialmente, cabe indicar las dificultades que presenta la administración por vías mucosas, especialmente de péptidos y proteínas, ya que dicha administración está fuertemente afectada por la limitada permeabilidad de las barreras epiteliales del cuerpo humano o animal. Es conocido asimismo que es posible superar parte de estas dificultades incorporando los ingredientes activos que se desean administrar en partículas de pequeño tamaño. El transporte a través de las mucosas de dichas partículas se ve afectado de forma determinante por el tamaño de estas partículas, aumentando el transporte con la disminución del tamaño de las partículas. Por lo tanto, el transporte a través de las mucosas de, por ejemplo, nanopartículas (en general, con un diámetro medio inferior a 1  $\mu\text{m}$ ), es mayor que el de micropartículas (en general, con un diámetro medio de 1  $\mu\text{m}$  hasta varios cientos  $\mu\text{m}$ ). De hecho, el transporte de nanopartículas a través de las mucosas del cuerpo humano o animal ocurre de forma natural. Asimismo, se conoce que la eficacia de la interacción entre las nanopartículas con las células epiteliales puede ser mejorada mediante la incorporación a las nanopartículas de materiales que contienen ligandos específicos. Por ejemplo, la absorción de liposomas por células M puede ser mejorada recubriendo dichos liposomas con residuos de manano, tal y como describen los documentos *Takada et al.*,

*Biochim. Biophys. Acta* 802, 1984, 237-243 y Tomizawa et al., *Pharm. Res.* 10, 1993, 549-552. Además, se sabe que las nanopartículas constituidas por quitosano fomentan el transporte de macromoléculas incorporadas en las mismas a través del epitelio nasal e intestinal.

5 Se conocen en el Estado de la Técnica una serie de publicaciones que se refieren a nanopartículas de quitosano para administración de ingredientes activos y a procedimientos de obtención para dichas nanopartículas. Entre dichas publicaciones cabe destacar Calvo et al., *J. Appl. Polym. Sci.* 1997, 63, 125-132; Calvo et al., *Pharm. Res.* 14, 1997b, 1431-1436; Fernández-Urrusuno et al., *Pharm. Res.* 16, 1991a, 1576-1581; Fernández-10 Urrusuno et al., *S.T.P. Pharm. Sci.* 9, 1999b, 429-436; Tokumitsu et al., *Pharm. Res.* 16, 1999, 1830-1835; Mitra et al., *J. Control. Release* 74, 2001, 317-323; US-A-2001051189, y US-A-5843509. Todas estas nanopartículas, cuyo componente mayoritario es el quitosano, tienen el inconveniente de que no son estables a determinados valores de pH, concretamente, se disuelven en medio ácido, y precipitan en medio básico.

15 El documento *WO-A-01/01964* por su parte se refiere a composiciones para la liberación retardada de biomoléculas, en forma de micropartículas, que comprenden un polímero aniónico y otro catiónico, los cuales interaccionan entre sí, y biomoléculas. El polímero catiónico puede ser un polímero con carga positiva, soluble en agua, como por ejemplo el quitosano. Como polímeros aniónicos se mencionan sulfato de dextrano, heparina, ácido algínico, alginato, caragenato, un polimetacrilato aniónico y un ácido 20 poliamínico cargado positivamente.

El documento *WO-A-96/20698* se refiere a nanopartículas para la liberación retardada de agentes bioactivos, que comprenden un núcleo a base de un polímero biocompatible y biodegradable, que puede ser quitosano, teniendo dichas nanopartículas 25 asociados o incorporados al menos un agente bioactivo y al menos un agente modificador de la superficie. Asimismo, se refiere a un procedimiento de obtención de las nanopartículas, basado en la mezcla de soluciones orgánicas de los componentes, y su posterior adición sobre una fase acuosa, con evaporación posterior del disolvente orgánico y separación de las nanopartículas de la fase acuosa resultante.

30 El documento *WO-A-01/32751* se refiere a un procedimiento para la elaboración de quitosanos o derivados de quitosano en forma de nanopartículas, con un diámetro de partícula medio en el intervalo de 10 hasta 1000 nm, que consiste en disolver el quitosano o derivado de quitosano en un medio acuoso ácido y elevar el pH de la disolución en

presencia de un agente modificador de superficie, hasta tal punto que se llega a la precipitación del quitosano.

El documento *WO-A-99/47130* se refiere a nanopartículas que presentan un complejo de polielectrolito biocompatible y biodegradable, a partir de al menos un 5 polícatión (que puede ser quitosano) y al menos un polianión, así como al menos un ingrediente bioactivo, siendo las nanopartículas obtenibles tratando adicionalmente el complejo de polielectrolito durante o después de su formación con al menos un agente reticulante (glioxal, TSTU o EDAP).

La mayoría de los sistemas conocidos de nanopartículas y micropartículas 10 elaborados a base de quitosano presentan la importante desventaja de ser inestables tras su administración *in vivo*, así como durante su almacenamiento. Suelen existir dificultades en el proceso de liofilización, específicamente problemas en la reconstitución de los sistemas liofilizados, lo cual representa una limitación importante adicional para la explotación adecuada de este tipo de sistemas. Además, para la liofilización de estos sistemas, descrita 15 en el estado de la técnica, es necesaria la adición de elevadas cantidades de azúcares. Como consecuencia de lo anterior, las nanopartículas y micropartículas conocidas deben, en general, ser almacenadas en forma de una suspensión líquida; esto normalmente tiene como consecuencia la destrucción de estos sistemas en pocos meses.

El glucomanano, por su parte, ha sido utilizado tradicionalmente como suplemento 20 dietético, con el fin de reducir el nivel de colesterol, además de que ha sido empleado en aplicaciones cosméticas. La utilización de glucomanano en la preparación de composiciones farmacéuticas está descrita en una serie de documentos. Por ejemplo, su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas en forma de geles se menciona en *WO-A-99/01166* y *US-A-5662840*; *Xiao et al., J. Appl. Polym. Sci. 76, 2000, 509-515* y *US-A-25 6159504* mencionan su uso en composiciones farmacéuticas en forma de películas; *US-A-2002019447* y *US-A-2002018812* mencionan composiciones farmacéuticas en forma de espumas, cápsulas y esponjas; y *US-A-6221393* en composiciones en forma de tabletas. Algunos de estos documentos mencionan la eventual incorporación de quitosano a las 25 composiciones farmacéuticas.

30 Se ha mencionado en algún documento la posible existencia de una interacción entre quitosano y glucomanano, por ejemplo en forma de películas en *Xiao et al., J. Appl. Polym. Sci. 76, 2000, 509-515*, así como en forma de gránulos con un diámetro mayor que 1 mm, para administrar fármacos analgésicos, en *Xie et al., J. Macromol. Sci., Pure Appl.*

*Chem. A29, 1992, 931-8* y *Xie et al., J. Clin. Pharm. Sci. 1, 1992, 42-8.* La publicación alemana DE19839515 se refiere a una preparación farmacéutica, que contiene al menos un producto de asociación polímero - ingrediente activo coloidal (tamaño de partícula de < 1  $\mu\text{m}$ ), en que al menos un componente es un polímero biocompatible y biodegradable, que 5 puede ser quitosano.

De acuerdo con todo lo anterior, existía una necesidad de proporcionar un tipo de nanopartículas, con propiedades mejoradas de absorción por el cuerpo humano y animal, especialmente a través del tejido mucosal, y las cuales pudieran ser almacenadas a más largo plazo sin sufrir alteraciones importantes. Además, habitualmente los procedimientos 10 para la preparación de nanopartículas, a base de quitosano o no, requieren el uso de disolventes orgánicos, los cuales presentan los problemas conocidos por cualquier experto medio en la materia, tales como su toxicidad y la dificultad de su eliminación de las nanopartículas, por lo que era conveniente encontrar un procedimiento para elaborar nanopartículas que cumplieran las propiedades arriba mencionadas, el cual fuera sencillo y 15 no necesitara el uso de disolventes orgánicos.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Se ha encontrado ahora que nanopartículas que comprenden quitosano, glucomanano, el ingrediente activo que se desea administrar, y, optativamente, una sal 20 aniónica, de forma preferida tripolifosfato sódico, resuelven los problemas del estado de la técnica mencionados. Además, se ha encontrado un método de preparación de las nanopartículas anteriores, sencillo y sin la necesidad de usar disolventes orgánicos.

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para elaborar nanopartículas con un diámetro medio inferior o igual a 1  $\mu\text{m}$ , que incorporan al 25 menos un ingrediente activo, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparar una disolución acuosa de quitosano,
  - b) preparar una disolución acuosa de glucomanano, y
  - c) mezclar, bajo agitación, las disoluciones de las etapas a) y b), de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano y glucomanano,
- 30 en el cual al menos una de las soluciones de las etapas a) y b) contiene al menos un ingrediente activo.

Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a nanopartículas obtenidas según el procedimiento anterior, que comprenden quitosano, glucomanano y al menos un ingrediente activo.

Según un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende las nanopartículas anteriores, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente o cosméticamente aceptable, respectivamente.

Según una forma de realización preferida del procedimiento, la disolución de glucomanano contiene además una sal aniónica, de forma preferida tripolifosfato sódico, con el fin de favorecer la formación espontánea de las nanopartículas.

De forma preferida, la concentración de la disolución de quitosano empleada en el procedimiento está en el intervalo entre 0,5 y 5 mg/mL.

Asimismo de forma preferida, la concentración de la disolución de glucomanano del procedimiento está en el intervalo entre 0,1 y 50 mg/mL.

La proporción de quitosano con respecto a glucomanano (en peso) puede variar, de forma preferida, entre 1:0,02 hasta 1:100, de forma especialmente preferida entre 1:0,5 y 1:50.

Durante el procedimiento de elaboración de las nanopartículas, el valor de pH de la disolución de quitosano de forma preferida se mantiene a un pH entre 2 y 6.

El procedimiento de elaboración de las nanopartículas de quitosano y glucomanano puede además comprender una etapa adicional, en la cual dichas nanopartículas son liofilizadas. Al contrario que en las nanopartículas conocidas en el estado de la técnica, para la liofilización de las nanopartículas según la presente invención únicamente es necesaria la adición de cantidades pequeñas de azúcares, aunque también es posible realizar la liofilización sin la adición de azúcares. En su forma liofilizada, las nanopartículas pueden ser almacenadas durante largos períodos de tiempo, y ser fácilmente regeneradas, en caso necesario, mediante la adición de la cantidad necesaria de agua.

De acuerdo con esta forma de realización adicional en que las nanopartículas obtenidas son liofilizadas, la presente invención se refiere además a las nanopartículas de quitosano y glucomanano, según la invención, liofilizadas, y a una composición farmacéutica o cosmética que comprende dichas nanopartículas liofilizadas, y al menos un excipiente farmacéuticamente o cosméticamente aceptable.

Las nanopartículas de quitosano y glucomanano obtenibles mediante el procedimiento arriba descrito presentan una estabilidad mejorada al contacto con líquidos biológicos y también durante el almacenaje que las nanopartículas conocidas en el estado de la técnica. De hecho, las nanopartículas de quitosano y glucomanano son estables en medio acuoso tanto ácido como básico, por lo que pueden ser almacenadas en forma de una suspensión líquida durante largos períodos de tiempo. Asimismo presentan una capacidad de absorción por el cuerpo humano o animal mejorada.

Además, las nanopartículas de quitosano y glucomanano son sistemas de utilidad tanto farmacéutica como cosmética. Además, pueden ser administradas por diversas vías, como por ejemplo tópica, oral, nasal, pulmonar, vaginal y subcutánea. El ingrediente activo a incorporar en las nanopartículas de quitosano y glucomanano es el ingrediente para el cual se destina la formulación. Este ingrediente tendrá un efecto sobre el organismo humano o animal tras su administración; dicho efecto puede ser curar, minimizar o prevenir una enfermedad. El ingrediente activo puede ser un fármaco, una vitamina, una vacuna, etc., o un agente cosmético, destinado a mejorar la apariencia física y estética (por ejemplo hidratación de la piel).

Las nanopartículas de quitosano y glucomanano según la presente invención presentan una alta capacidad de asociación de macromoléculas bioactivas, por ejemplo insulina, albúmina de suero bovino o proteínas inmunogénicas. La capacidad de asociación depende del tipo de macromolécula incorporada. Asimismo, para determinadas macromoléculas, el grado de asociación puede depender del grado de desacetilación del quitosano: cuanto mayor es el grado de desacetilación, mayor es la eficacia de asociación.

No obstante, también es posible incorporar otros ingredientes activos a las nanopartículas, tanto de carácter lipofílico como hidrofílico. Cabe destacar, por ejemplo, la incorporación eficaz de indometacina (moderadamente lipofílico) y de aciclovir (hidrofílico).

El ingrediente activo a incorporar en las nanopartículas es disuelto en una de las dos disoluciones acuosas empleadas en la formación de las nanopartículas. En el caso de ingredientes activos lipofílicos, éstos se habrán de disolver previamente en un disolvente orgánico polar, miscible con medios acuosos, y seguidamente se adicionará a la solución de quitosano, o bien a la solución de glucomanano. En el caso de incorporar más de un ingrediente activo a las nanopartículas, éstos pueden estar disueltos o en la misma disolución o en diferentes disoluciones.

En el caso de incorporar macromoléculas bioactivas, éstas pueden ser incorporadas de forma preferida según los siguientes métodos:

- i) la macromolécula es disuelta en tripolifosfato sódico, y la mezcla resultante es incorporada a la disolución de glucomanano empleada para la elaboración de las nanopartículas;
- 5 ii) la macromolécula es disuelta en una disolución de NaOH; la disolución obtenida es añadida a tripolifosfato sódico; la mezcla resultante es incorporada a la disolución de glucomanano empleada para la elaboración de las nanopartículas;
- 10 iii) la macromolécula es disuelta en fosfato sódico a pH 6,6; la disolución obtenida es añadida a tripolifosfato sódico; la mezcla resultante es incorporada a la disolución de glucomanano empleada para la elaboración de las nanopartículas;
- iv) la macromolécula es añadida a la disolución de quitosano empleada para la elaboración de las nanopartículas.
- 15 v) la macromolécula es añadida a una disolución de NaOH; la mezcla obtenida es adicionada a la disolución de quitosano empleada para la elaboración de las nanopartículas;
- vi) la macromolécula es añadida a una disolución de fosfato sódico a pH 6,6; la mezcla obtenida es adicionada a la disolución de quitosano empleada para la elaboración de las nanopartículas.

20 Las nanopartículas de quitosano y glucomanano son de naturaleza coloidal, es decir, su diámetro medio es igual o inferior a 1 µm. El tamaño medio de las partículas se ve influenciado principalmente por la proporción de quitosano con respecto a glucomanano, por el grado de desacetilación del quitosano, por la incorporación de una sal aniónica, por ejemplo tripolifosfato sódico, y por la naturaleza del ingrediente activo. Por otra parte, las 25 nanopartículas pueden presentar una carga superficial positiva o negativa (medida mediante el potencial zeta), cuya magnitud depende de la composición de las nanopartículas y del grado de desacetilación del quitosano.

Además, las nanopartículas tienen la capacidad de liberar de forma retardada y/o controlada el ingrediente activo incorporado a las mismas. La liberación del ingrediente 30 activo puede controlarse combinando factores como la proporción de quitosano con

respecto a glucomanano, el grado de desacetilación del quitosano y el método de elaboración de las nanopartículas.

A continuación, otros fines, características y ventajas de la invención aparecerán claramente a la luz de la descripción explicativa que sigue realizada con referencia a varios 5 ejemplos ilustrativos que no suponen en modo alguno limitar el alcance de la invención.

#### EJEMPLOS:

A lo largo de los ejemplos se emplean las siguientes abreviaturas:

CS = Quitosano

10 GM = Glucomanano fosforilado

TPP = Tripolifosfato sódico

P1: Proteína de origen vegetal (*Ricinus communis*) constituida por dos polipéptidos.

#### Ejemplo 1

Se prepararon nanopartículas de quitosano (con un grado de desacetilación del 15 88%), glucomanano y tripolifosfato sódico según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones de glucomanano. Una vez preparadas, se midió su diámetro medio y su potencial zeta.

#### Tabla 1

CS/TPP/GM (p/p)	Diámetro medio (nm)	Potencial zeta (mV)
6/1/2.3	250 ± 24	+ 32.2 ± 2.0
6/1/4.6	302 ± 26	+ 15.2 ± 1.7

#### Ejemplo 2

Se prepararon nanopartículas de quitosano (con un grado de desacetilación del 88%), y glucomanano, sin la adición de ninguna sal aniónica, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones de glucomanano. Una vez preparadas, se midió su diámetro medio y su potencial Z.

**Tabla 2**

CS/GM (p/p)	Diámetro medio ( nm )	Potencial Zeta ( mV )
6/4.6	252.1 ± 15	+ 31.25 ± 1.06
6/13.8	185.5 ± 3	+ 33.2 ± 0.8

**Ejemplo 3**

Se prepararon nanopartículas de quitosano (con un grado de desacetilación de 88%) y glucomanano, incorporando tripolifosfato sódico, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones de quitosano y glucomanano, incorporando la proteína P1 o insulina. Una vez preparadas, se midió su diámetro medio y su potencial Z.

**Tabla 3**

CS/TPP/GM (p/p/p)	Proteína asociada	CS/proteína (p/p)	Diámetro medio ( nm )	Potencial zeta (mV)
4/1/1.5	P1	1.6/1	552 ± 4	+32.1 ± 1
6/1/4.6	P1	1.3/1	296 ± 6	+15.9 ± 0.2
6/1/4.6	P1	2.2/1	263 ± 6	+30.3 ± 0.6
6/0.7/4.6	Insulina	2/1	265.8 ± 6	+32.2 ± 0.4

**Ejemplo 4**

Se prepararon nanopartículas de quitosano (con un grado de desacetilación de 88%) y glucomanano, sin incorporar ninguna sal aniónica, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones de quitosano y glucomanano, incorporando la proteína P1 o insulina. Una vez preparadas, se midió su diámetro medio y su potencial Z.

**Tabla 4**

CS/GM (p/p)	Proteína asociada	Diámetro medio ( nm )	Potencial zeta (mV)
6/4.6	Insulina	252.3 ± 4	+ 15.5 ± 0.6
6/4.6	P1	205 ± 11	+ 8.5 ± 2.7
6/13.8	P1	293.2 ± 5	+ 11.9 ± 3.2

Ejemplo 5

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%) y glucomanano, incorporando tripolifosfato sódico, según el procedimiento de la invención, 5 con una proporción de CS/TPP de 3:1, incorporando en las mismas proteína P1 (carga teórica 25%), según diferentes métodos. Se midió la eficacia de asociación de la proteína P1 a las nanopartículas, así como la capacidad de carga de las mismas.

**Tabla 5**

Método	Eficacia de asociación (%)	Capacidad de carga (%)
TPP <sup>i</sup>	15.4 ± 2.7	8.1 ± 1.4
NaOH-TPP <sup>ii</sup>	5.6 ± 0.3	3.2 ± 0.2
Fosfato-TPP <sup>iii</sup>	22.6 ± 0.2	11.1 ± 0.1
CS <sup>iv</sup>	15.5 ± 2.7	7.1 ± 1.2
NaOH-CS <sup>v</sup>	8.7 ± 3.2	5.1 ± 1.8
Fosfato-CS <sup>vi</sup>	26.0 ± 0.1	11.9 ± 0.5

10 P1 fue disuelto en

<sup>i</sup> TPP;

<sup>ii</sup> NaOH, y adicionado a TPP;

<sup>iii</sup> fosfato de sodio a pH 6.6, y adicionado a TPP;

<sup>iv</sup> CS;

15 <sup>v</sup> NaOH, y adicionado a CS; y

<sup>vi</sup> fosfato de sodio a pH 6.6, y adicionado a CS

Ejemplo 6

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%) y glucomanano, incorporando tripolifosfato sódico, según el procedimiento de la invención, 20 con una proporción de CS/TPP de 6:1, incorporando en las mismas proteína P1 (carga

11

teórica 25%), según diferentes métodos. Se midió la eficacia de asociación de la proteína P1 a las nanopartículas, así como la capacidad de carga de las mismas.

**Tabla 6**

Método	Eficacia de asociación (%)	Capacidad de carga (%)
TPP <sup>i</sup>	13.3 ± 4.0	16.8 ± 4.9
NaOH-TPP <sup>ii</sup>	8.7 ± 1.6	10.5 ± 1.9
Fosfato-TPP <sup>iii</sup>	26.3 ± 1.2	27.6 ± 1.3
CS <sup>iv</sup>	6.5 ± 1.7	9.8 ± 2.6
NaOH-CS <sup>iv</sup>	18.2 ± 1.9	21.4 ± 2.4
Fosfato-CS <sup>vi</sup>	24.5 ± 1.6	25.4 ± 1.7

5 P1 fue disuelto en:

<sup>i</sup> TPP;

<sup>ii</sup> NaOH, y adicionado a TPP;

<sup>iii</sup> fosfato sódico a pH 6.6, y adicionado a TPP;

<sup>iv</sup> CS;

<sup>v</sup> NaOH, y adicionado a CS; y

<sup>vi</sup> fosfato sódico a pH 6.6, y adicionado a CS.

**Ejemplo 7**

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%) y glucomanano, sin incorporar ninguna sal aniónica, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones de CS/GM, incorporando en las mismas proteína P1. Se midió la eficacia de asociación de la proteína P1 a las nanopartículas, así como la capacidad de carga de las mismas.

CS/GM (p/p)	Proteína asociada	Eficacia de asociación (%)	Capacidad de carga (%)
6/4.6	P1	37.3 ± 3.8	19.16 ± 1.95
6/13.8	P1	22.4 ± 7.1	4.46 ± 1.41

20

Ejemplo 8

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%) y glucomanano, sin incorporar ninguna sal aniónica, según el procedimiento de la invención, incorporando en las mismas proteína P1 o insulina. Se midió la eficacia de asociación de la 5 proteína P1 y la insulina a las nanopartículas, así como la capacidad de carga de las mismas.

CS/GM (p/p)	Proteína asociada	Eficacia de asociación (%)	Capacidad de carga (%)
6/4.6	P1	37.3 ± 3.8	19.16 ± 1.95
6/4.6	Insulina	37.5 ± 3.1	23.77 ± 1.78

10 Ejemplo 9

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%) y glucomanano, según el procedimiento de la invención, incorporando en las mismas indometacina o aciclovir. Se midió la eficacia de asociación de la indometacina y del aciclovir a las nanopartículas, así como el diámetro de las mismas.

Fármaco asociado	Eficacia de asociación (%)	Diámetro medio (nm)
Indometacina	81.81 ± 3.89	619 ± 15
Aciclovir	27.36 ± 7.90	304 ± 8

15

Ejemplo 10

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%), glucomanano y tripolifosfato sódico, según el procedimiento de la invención, con 20 diferentes proporciones CS/TPP/GM. Sobre las mismas se ha comprobado el efecto del tipo y de la concentración de agente crioprotector utilizado en la liofilización de las nanopartículas sobre el tamaño y el potencial zeta de las partículas (Df: diámetro final, Di: diámetro inicial). (ver figura 1)

Ejemplo 11

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%), glucomanano y tripolifosfato sódico, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones CS/TPP/GM. Durante su incubación en una disolución tampón de fosfato a pH 7,4 durante 2 horas, se midió el diámetro medio de las partículas. 5 Proporciones teóricas CS/TPP/GM: (●) 3/1/13.5, (■) 3/1/6.7 y (▲) 6/1/23. (ver figura 2)

Ejemplo 12

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%), glucomanano, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones 10 CS/GM. Durante su incubación en una disolución tampón de fosfato a pH 7,4, se midió el diámetro medio de las partículas. (▲) CS/GM = 6/4.6; (◆) CS/GM = 6/13.8; (■) CS/TPP/GM = 6/1/4.6. (ver figura 3)

Ejemplo 13

Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%), 15 glucomanano, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones CS/GM, incorporando insulina. Se midió la liberación de la insulina en tampón de fosfato a pH 7,4 y 37 °C. (●) CS/TPP/GM = 6/1/4.6 y (■) CS/GM = 6/4.6. (ver figura 4)

Ejemplo 14

20 Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 88%), glucomanano, según el procedimiento de la invención, con diferentes proporciones CS/GM, incorporando proteína P1. Se midió la liberación de la insulina en tampón de fosfato a pH 7,4 y 37 °C. (●) CS/TPP/GM = 6/1/4.6 y (■) CS/GM = 6/4.6 (ver figura 5)

Ejemplo 15

25 Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 42% y 88%) y glucomanano, según el procedimiento de la invención, incorporando <sup>125</sup>I-BSA. Las nanopartículas fueron administradas oralmente a ratones, y se midieron los niveles de radioactividad en la sangre tras 2, 4, 6 y 24 horas. (ver figura 6)

Ejemplo 16

30 Se prepararon nanopartículas de quitosano y glucomanano, según el procedimiento de la invención, incorporando BSA-<sup>125</sup>I. Las nanopartículas fueron

14

administradas de forma intraduodenal a ratones, y se midieron los niveles de radioactividad en la sangre tras 0.5, 2 y 24 horas. Se utilizaron nanopartículas de quitosano como control. (ver figura 7)

Ejemplo 17

5 Se prepararon nanopartículas de quitosano (grado de desacetilación 42% y 88%) y glucomanano, según el procedimiento de la invención, incorporando BSA-<sup>125</sup>I. Las nanopartículas fueron administradas oralmente a ratones, y se midieron los niveles de radioactividad en diferentes tejidos tras 24 horas. (ver figura 8)

Ejemplo 18

10 Se prepararon nanopartículas de quitosano y glucomanano, según el procedimiento de la invención, incorporando BSA-<sup>125</sup>I. Las nanopartículas fueron administradas de forma intraduodenal a ratones, y se midieron los niveles de radioactividad en diferentes tejidos tras 24 horas. Se utilizaron nanopartículas de quitosano como control. (ver figura 9)

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas, con un diámetro medio igual o inferior a 1  $\mu\text{m}$ , y que incorporan al menos un ingrediente activo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
  - a) preparar una disolución acuosa de quitosano,
  - b) preparar una disolución acuosa de glucomanano y
  - c) mezclar, bajo agitación, las disoluciones de las etapas a) y b), de modo que se obtienen espontáneamente las nanopartículas de quitosano y glucomanano,
- 10 en el cual al menos una de las soluciones de las etapas a) y b) contiene al menos un ingrediente activo.
2. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución de glucomanano contiene una sal aniónica.
- 15 3. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según la reivindicación 2, caracterizado porque la sal aniónica es tripolifosfato sódico.
4. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según la reivindicación 3, caracterizado porque el tripolifosfato sódico está en una concentración de entre 0,1 y 5 mg/mL.
- 20 5. Procedimiento para la elaboración de nanoparticulas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la concentración de la disolución de quitosano está en el intervalo entre 0,5 y 5 mg/L.
6. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la concentración de la disolución de glucomanano está en el intervalo entre 0,5 y 50 mg/L.
- 25 7. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la proporción entre quitosano y glucomanano está entre 1:0,1 y 1:100.
8. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, caracterizado porque la proporción entre quitosano y glucomanano está entre 1:0,5 y 1:50.

9. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la disolución de quitosano presenta un pH entre 2 y 6.

10. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las 5 reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el ingrediente activo es una macromolécula bioactiva.

11. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el ingrediente activo se selecciona del grupo que comprende insulina, albúmina de suero bovino y proteínas inmunogénicas.

10 12. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el ingrediente activo es un fármaco de bajo peso molecular.

15 13. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 12, caracterizado porque el ingrediente activo se selecciona del grupo que comprende aciclovir e indometacina.

14. Procedimiento para la elaboración de nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque comprende una etapa adicional después de la etapa c), en la cual las nanopartículas son liofilizadas.

20 15. Nanopartículas con un diámetro medio igual o inferior a 1 µm, para la administración de al menos un ingrediente activo, caracterizadas porque comprenden quitosano, glucomanano y al menos un ingrediente activo.

16. Nanopartículas según la reivindicación 15, caracterizadas porque son obtenibles mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11.

25 17. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 y 16, caracterizadas porque además comprenden una sal aniónica.

18. Nanopartículas según la reivindicación 17, caracterizadas porque la sal aniónica es tripolifosfato sódico.

19. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizadas porque el ingrediente activo es una macromolécula bioactiva.

20. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizadas porque el ingrediente activo se selecciona del grupo que comprende insulina, albúmina de suero bovino y proteínas inmunogénicas.

21. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizadas 5 porque el ingrediente activo es un fármaco de bajo peso molecular.

22. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 y 21, caracterizadas porque el ingrediente activo se selecciona del grupo que comprende aciclovir e indometacina.

23. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, caracterizadas 10 porque la proporción quitosano : glucomanano está entre 1:0,02 y 1:100.

24. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, caracterizadas porque la proporción quitosano : glucomanano está entre 1:0,5 y 1:50.

25. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, caracterizadas porque son liofilizadas tras su obtención.

15 26. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 27. Composición cosmética, caracterizada porque comprende las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

28. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende las nanopartículas de la reivindicación 25, tras ser regeneradas mediante la adición de agua, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 29. Composición cosmética, caracterizada porque comprende las nanopartículas de la reivindicación 25, tras ser regeneradas mediante la adición de agua, y al menos un excipiente cosméticamente aceptable.

1 / 5

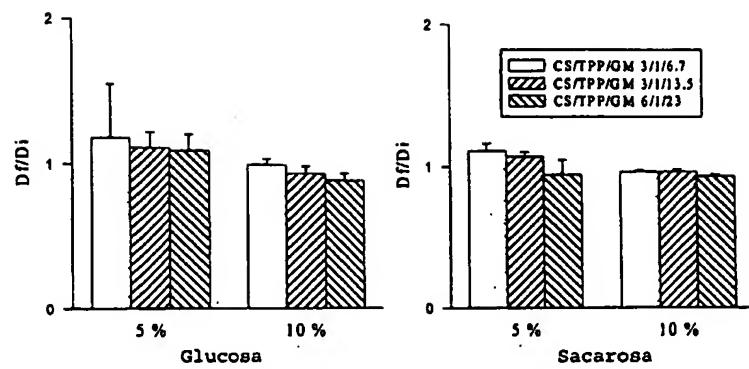


FIG. 1

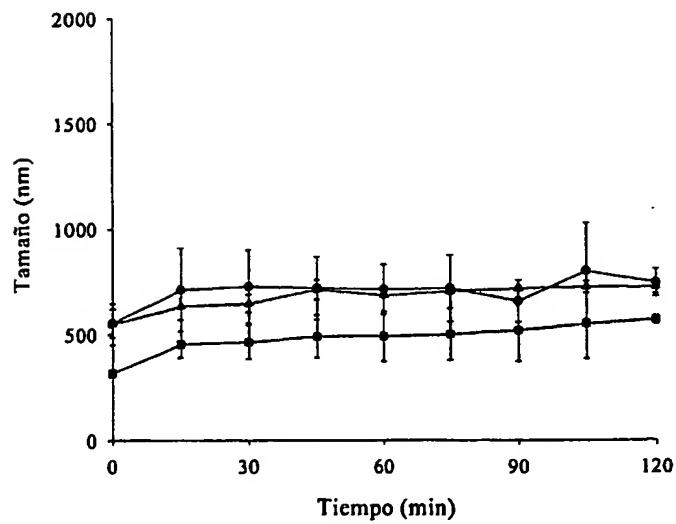


FIG. 2

2/5

FIG. 3

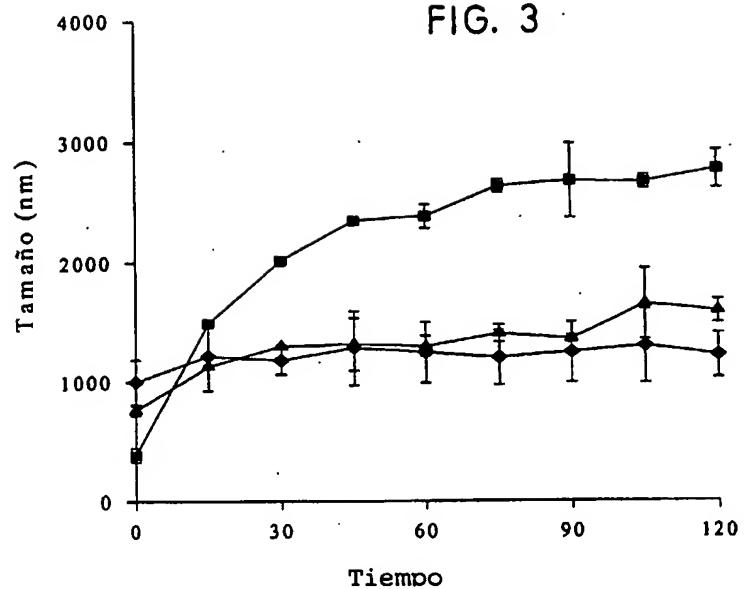
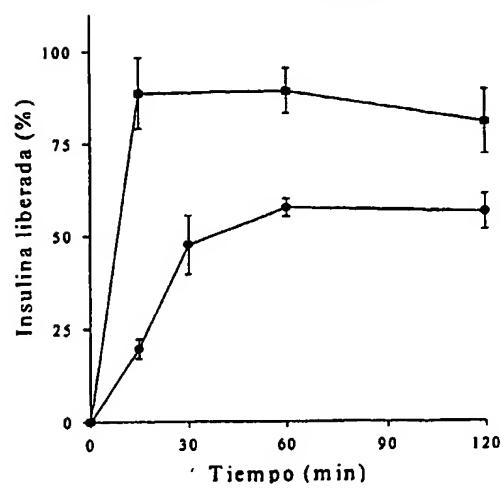


FIG. 4



3 / 5

FIG. 5

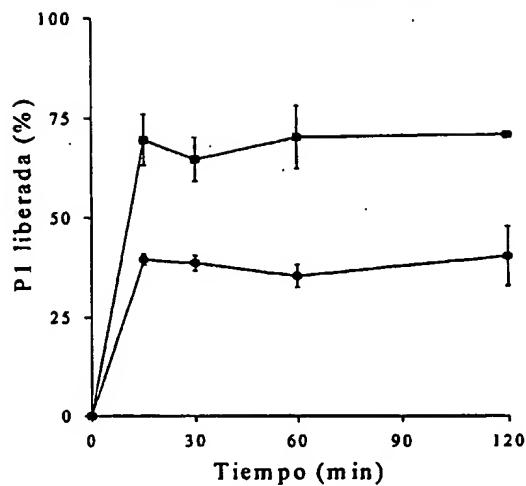
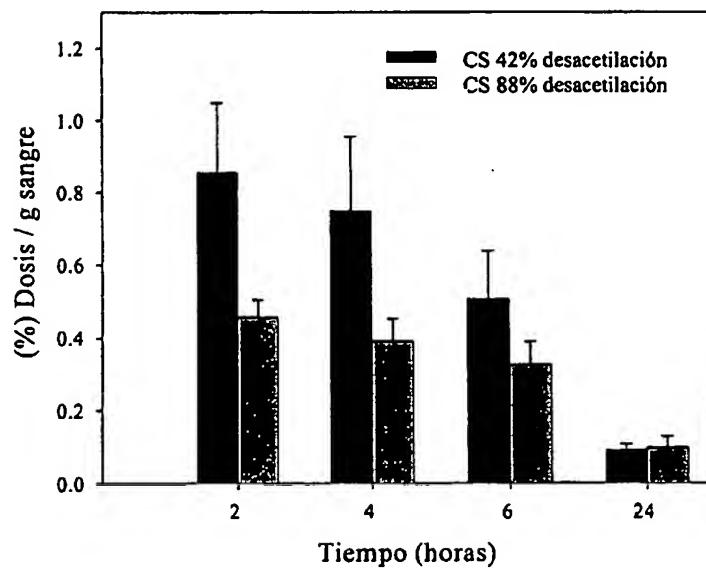


FIG. 6



4 / 5

FIG. 7

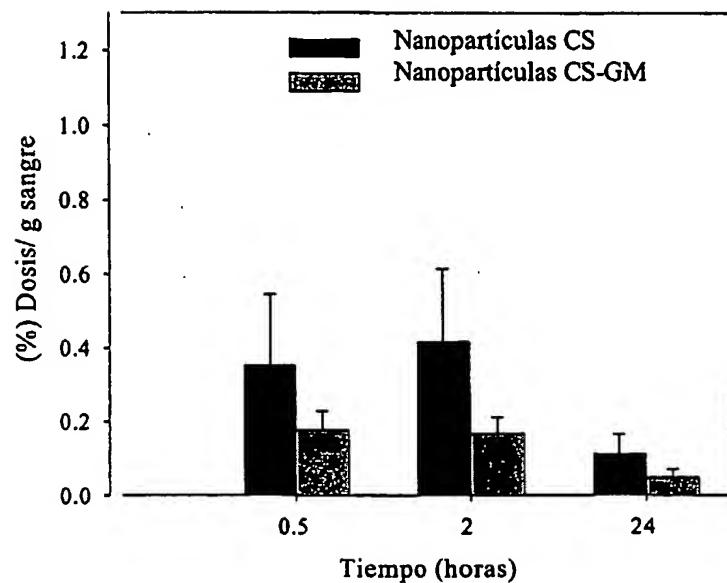
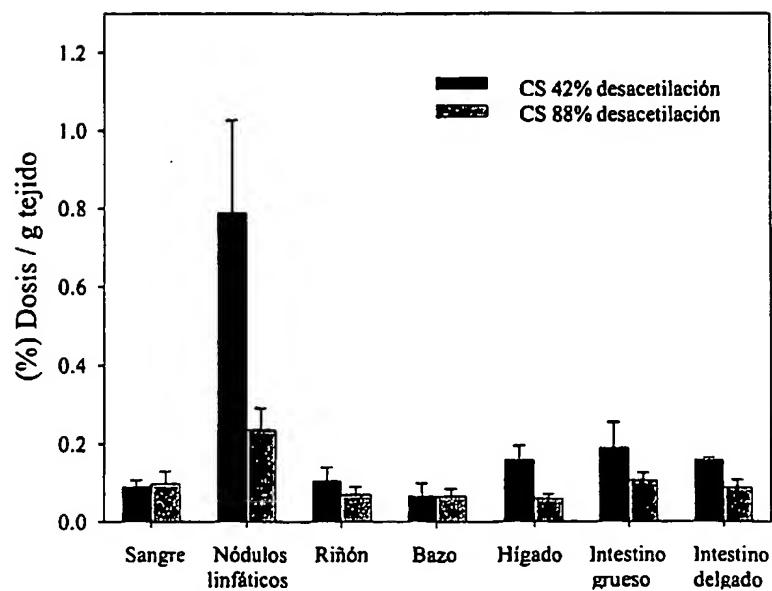


FIG. 8



5 / 5

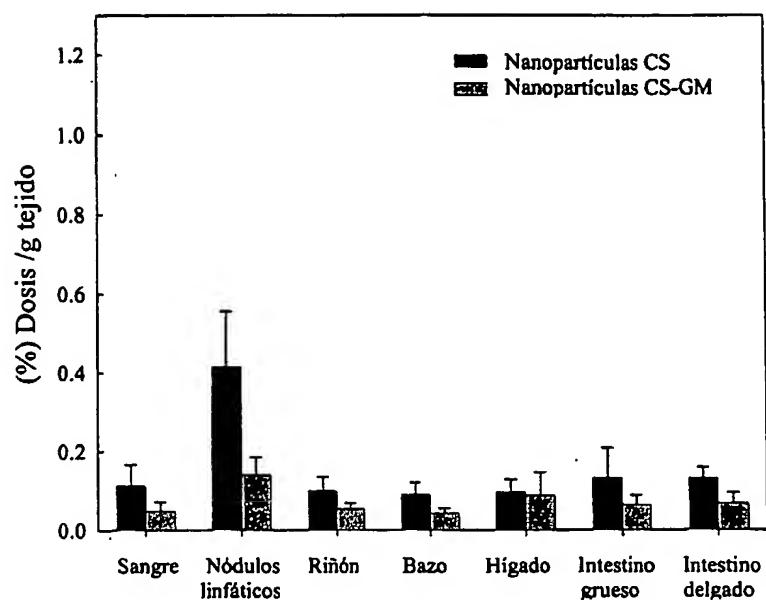


FIG. 9

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 03/00372

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**IPC7 A61K 9/51**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC7 A61K 9/16, 216F**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, EMBASE, MEDLINE, CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0860166 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 26.08.1998, page 2 lines 5-20, page 3, lines 12-21, 36, example 2.	1-29
A	US 5562924 A (ERIC PERRIER VIENNE et al.) 08.10.1996, column 1, line 3, lines 6-67; column 2, lines 15-30; example 1, 5.	1-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2003 (27.10.2003)

Date of mailing of the international search report

19 NOV 2003 19.11.03

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
**PCT/ ES 03/00372**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0860166	26.08.1998	CA 223350 WO 9864244 ES 2114502 US 2001051189	05.02.1988 05.02.1998 16.05.1998 13.12.2001
US 5562924 A	08.10.1996	AU 5522496 WO 9736474	22.10.1997 09.10.1997

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00372

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> A61K 9/51

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP<sup>7</sup> A61K 9/16, 216F

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, EMBASE, MEDLINE, CA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	EP 0860166 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 26.08.1998, página 2 líneas 5-20, página 3, líneas 12-21, 36, ejemplo 2.	1-29
A	US 5562924 A (ERIC PERRIER VIENNE et al.) 08.10.1996, columna 1, línea 3, líneas 6-67; columna 2, líneas 15-30; ejemplo 1, 5.	1-29

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

- \* Categorías especiales de documentos citados: "T" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de "X" prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
27 Octubre 2003 (27.10.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional  
**19 NOV 2003 19.11.03**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional O.E.P.M.  
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
Nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado  
**M. Ybarra Fernández**  
Nº de teléfono + 34 91 3495530

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00372

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0860166	26.08.1998	CA 223350 WO 9864244 ES 2114502 US 2001051189	05.02.1988 05.02.1998 16.05.1998 13.12.2001
US 5562924 A	08.10.1996	AU 5522496 WO 9736474	22.10.1997 09.10.1997